



臭いセンサーマイクロチップの開発

著者	岩佐 達郎, 大田 健吾
雑誌名	サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー 年報
巻	4
ページ	70-73
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10258/410

臭いセンサーマイクロチップの開発

著者	岩佐 達郎, 大田 健吾
雑誌名	サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー 年報
巻	4
ページ	70-73
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10258/410

臭いセンサーマイクロチップの開発

室蘭工業大学 材料物性工学科

岩佐達郎、大田健吾

1. 序

人はものすごく多種類の香り、「匂い」を区別することができるが、それらの違いを数値化したり、定量的に評価することは難しい。又、個人差のあることも知られているが、その個人差を表現することも困難である。そこで、色々の「匂い」を定量的にマッピングし、一目で「匂い」の種類の違いを示すことの出来るセンサーチップが開発されれば、それによって、「匂い」の種類の違いや、個人的な「匂い」感受性の違いなどを数値化して示すことが出来ると期待される。

本研究では、「匂い」の多様性を生物学的な観点から検討し、それを定量的に表現出来るようなセンサーチップの開発を目指している。まず、研究の進んでいるイモリの嗅上皮から嗅覚受容体タンパク質遺伝子を得るために、cDNA ライブラリーの作成、その EST 解析を行っている。

2. 嗅覚とは

“嗅覚”と言われると多くの人は“鼻”をイメージするだろう。しかし、“鼻”は匂い分子を受け取る嗅細胞が多く存在するが、これだけでは厳密には嗅覚とは呼べない。匂い分子を受け取った嗅細胞はその信号を脳に伝え、この事象の全てを総称し、嗅覚と呼ぶ。だから、嗅細胞にある嗅覚受容体は「嗅覚」の入り口と言うことになる。

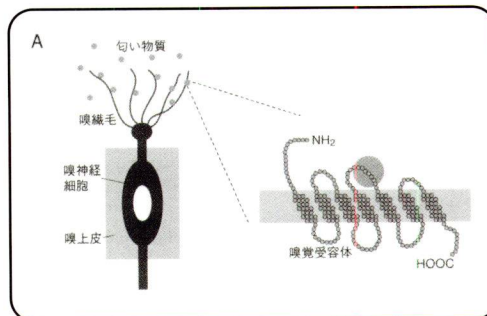


図1. 嗅細胞と嗅覚受容体

鼻の内部は粘膜に覆われ、その下には嗅上皮がある。嗅細胞は図1の左の様なかたちで嗅上皮に埋め込まれた形で数多く存在し、粘膜に覆われた嗅毛はここで匂い分子をキャッチする。匂い分子の受容は電気信号という形で脳に伝わっていく。

嗅細胞というものは一つだけでなく、それに応じて受容体の種類も数多くある。一種類の匂い分子でも複数の受容体によって同時に認識され、この受容体からの信号の組み合わせによって匂いの質を決定していると考えられる。

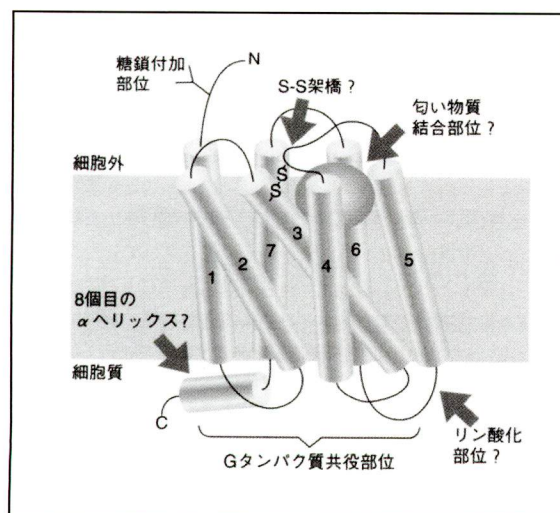
3. センサーチップ

何種類かの嗅覚受容体タンパク質分子（またはその誘導体）と「匂い」分子との相互作用を高感度で検出し、それとヒトの感覚的表現とを結びつければ、種々の多様な「匂い」の定量的な表現が出来るのでは、と考えられる。そこで、表面プラズモン共鳴を利用して、種々の嗅覚受容体と匂い分子との相互作用を検出するセンサーチップを考えた。

3 1. 嗅覚受容体遺伝子

嗅覚受容体は受容した信号をGタンパク質に伝達するGタンパク質共役受容体（GPCR：G protein coupled receptor）と呼ばれるグループに属する。光受容体ロドプシン類、神経伝達物質受容体、ホルモン受容体、嗅覚受容体を含む生物の持つ情報伝達に關与するタンパク質群でも最も大きなグループの一つである。現在市販されている医薬品の50%以上はこの情報伝達系に作用していると予想され、創薬研究のターゲットとなっている。

Gタンパク質共役受容体分子は全て7本の膜貫通構造を持つと考えられているので、嗅覚受容体タンパク質も嗅上皮膜を貫いて存在する7本の α ヘリックス構造を取ると考えられている。図2に、最近明らかになった視物質ロドプシンの結晶構造モデルを基にして、アミノ酸配列の相同性から作成された嗅覚受容体の膜内構造モデルを示した。



Touhara K. 細胞工学、21(2002)

図2. 嗅覚受容体モデル図

3 2. SPR

表面プラズモン共鳴（SPR）を利用した生体分子相互作用解析装置の検出部概略図を図3に示した。金属／液体界面（センサー表面）での密度の変化は表面層（光照射面）近くでの屈折率の変化を起こし、それをSPRシグナルの変化として検出する。リガンド（Y）にサンプル中のアナライト（○）が結合すると更に屈折率とSPRシグナルが変化する。「分子のラベル」操作が必要なく、高感度に生体分子相互作用が解析できる点が優れている。

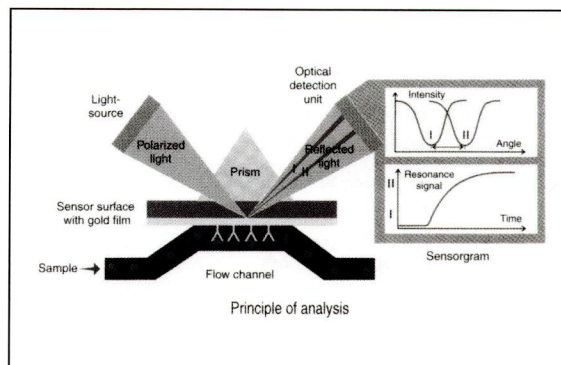


図3. 生体分子相互作用解析装置の検出部概略

センサー表面に匂い分子と相互作用するリガンドを固定化し、匂い分子との相互作用を測定することになる。しかし、嗅覚受容体は膜貫通型タンパク質であり、脂質の存在しない状態では不安定で、センサー表面に固定化することが難しい。そこで、膜受容体タンパク質を含む膜を取り込んだ脂質小胞を作成し、これをセンサー表面に固定化する方法が考えられる。

4. 研究の進行計画とクリアすべき課題

匂いセンサーチップ開発には大きく二つの課題をクリアする必要があると思われる。

①. 受容体遺伝子の単離と発現系の構築：ま

ず、センサーチップ上に固定化する嗅覚受容体タンパク質（又はその誘導体）を作成するための原材料を提供する嗅覚受容体遺伝子の単離と発現系の構築が必須である。これについて、現在研究が進行しており、後ほど詳しく述べる。以下に研究の進行計画を示す。

・ 受容体遺伝子の単離と発現系の構築

1. 嗅上皮から mRNA を分離し、cDNA ライブラリーを作成する。
2. EST 解析を行い、嗅上皮で発現するタンパク質を網羅する。
3. ヒトゲノム解析の結果より、嗅覚受容体分子は347種類と見積もられている。マウスでは873種類、魚類では100種類程度と見積もられているが、初期的には10種類でも得られれば、かなりの「匂い」の差別化は可能と期待される。
4. 嗅覚受容体をコードすると思われる cDNA は全長配列を得る。
5. 嗅覚受容体タンパク質を発現させる。
6. 受容体タンパク質は発現細胞の膜分画に存在するので、膜分画を回収
7. この膜断片を金薄片に固定化する。
8. 金薄片を微少な区画に分割し、その区画に異なる受容体タンパク質を固定化したチップを作製する。
9. 試料を溶液に溶かした状態でチップ上にアブライシ、受容体と反応させる。
10. 表面プラズモン共鳴を利用して相互作用している受容体、およびその相互作用の強度を数値化する。

②. センサーチップの高密度化と高感度化：もう一つの大きな課題がセンサーチップの高密度化と高感度化である。現在市販されている SPR を利用した生体分子相互作用解析装置の反応セルでは4種類のリガンドの固定化が可能であるしかし、「匂い」分子を区別して定量的に表現するためにはもっと多種のリガンド（受容体タンパク質）の固定化が必須であると思われる。この問題をクリアーするために、工学的発想からのご助力を期待している。

4. 嗅上皮 cDNA ライブラリーの作成

イモリ嗅上皮：77 mg（2匹）から全 RNA、43 ug、更に嗅上皮 368 mg（10匹）から 145.9 ug の全 RNA を得た。得られた全 RNA を全て使用して mRNA 精製を行い、およそ 5 ug の mRNA が得られた。この mRNA を全量使用して cDNA ライブラリーを作成（λ Zap II 使用）した。作成した cDNA ライブラリーのタイターをチェックした結果、 4.89×10^5 個の独立したクローンのライブラリーが得られた事が分かった。

次に、ライブラリーのインサートサイズを調

べるため、ファージクローンから直接 PCR でインサート部分の DNA を増幅した。調べた 18 クローンの内、13 クローンでインサートサイズが 1000bp を越えていたので、使用するに十分なライブラリーが出来たと判断した。

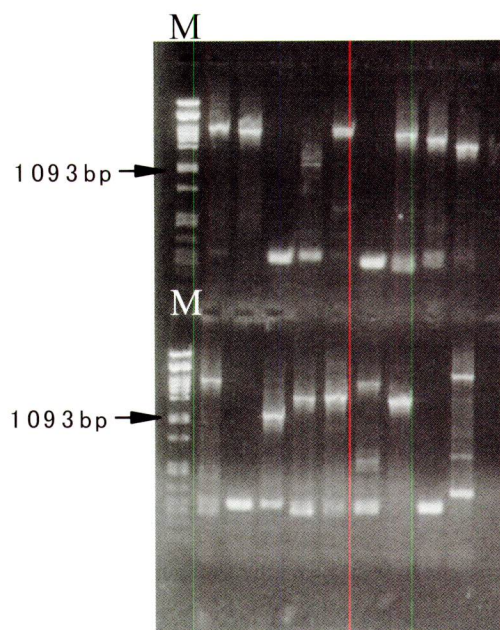


図4. 作成した cDNA ライブラリーのインサートサイズの検討。

5. EST 解析

嗅覚受容体遺伝子は非常に種類が多く、ヒトではヒトゲノム解析の結果より、347種類と見積もられている。マウスでは873種類、魚類では100種類程度と見積もられている。ヒトの全遺伝子は35000程度と見積もられており、嗅覚受容体遺伝子はおおよそ1%を占めることになる。嗅上皮より作成したライブラリーでは更にその割合は高くなるものと予想し、cDNA ライブラリーのクローンのDNA配列を網羅的に決定していくこととした。このような網羅的解析を行うには一般的にEST解析と呼ばれる手法が取られる。ESTは Expression Sequence Tag の略

である。クローンの全DNA配列を決定しなくとも、5'側配列を（又は同時に3'側配列も）500bp程度決定しておけば、そのcDNAのコードするタンパク質をある程度識別することは出来る。そこで、網羅的に多数のクローンに対して、5'側配列を決定し、嗅覚受容体遺伝子と予想されるクローンについて全長配列を決定するという方法を取ることにした。これまでに得られた配列の一例を図5に示した。

次に、得られた配列がどのようなタンパク質をコードしているものであるのか、全く新奇な物であるのか等を知るために、遺伝研データベースに登録されている配列の中に相同性を示す物があるかどうかをBlastXという解析プログラムを用いて検索する。

BlastXによる解析例：試料1-19

解析した配列

DDBJ BLAST E-Mail server Version 2.00
Request ID is 20030116161058_16244

Your query is

> 1-19

```
GAATTCGGCAGCAGGTTAGGAGACAGAGTCCTCCAGCCATAAGNGACCCAG
TAGTCACAGACAGCTTGNAGTATCTTGAAGACCATCATGTCTGCGATGTG
GATAAGCCTTGNGTCTGCTCTTCTCAGGCCTGCTTCAGGTGCCGGCTATG
GAGATTCAGTGATGAGCACTTTGACCCTCAGAAGATTCTAGGGAAGTG
GTATGCTGTTGAGTGGCATCAAACTGTCCAGAATTTGTTCAAGATGAAGT
CGGTGATGAAGATGCCCATCACCATTTCAGCGTACTTGACGACGGGGAC
CTGTATGCTGCCACAGGCGTCCAGGACCTTCAGGATGCATGAAGATGGAT
ATGGTGTACCATAAAGCCAAACACGGTCAATACACTCAAAGTGTCTCGA
CAACAGTGACATCCGATTGTTNGATGGGGACTTTGATCATTAGTGCTCTT
GGGAGTACACCCAAATGTCTCAGAAAGCGGTGATGCCTGCAAGATGGTG
AACTGTTAGTCAAGACAGCCAGAANTCGCTTGAAATCCCTGCTTAACCA
TAGANCACTTCAAGATGCTGATNCCGGTACTTNGGGNTATCAATNGGATN
ACGTCNCCCCCTTGCCANANANNTTACTGTGCTCAGAAATTTNANGG
GATTTCAAANCAAAACCTTGCCCTTANAACGGGTGCTNGTGGNAAAA
ACCCCTTNCNAAAACTTGNTNNTTNCNTNNGNNTC
```

図5. EST解析で得られた配列の一例

相同性を示した既知配列

BLASTX 2.0.11 [Jan-20-2000]
Query= 1-19 (735 letters)

Database: PROTEIN: PIR + SWISS-PROT + DAD + FDBSH + PRF protein
sequence database [Last update Jan/16/2003]
2,011,780 sequences; 647,491,042 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
dad M15531-1 AAA49529.1 177 Rana pipiens protein (Frog (R.pi...	52	3e-05
sp P06910 OLFA_RANFI Olfactory protein precursor.	52	3e-05
pir A25837 OVFGP olfactory protein precursor - northern leopard...	52	3e-05

アミノ酸配列に変換してのアライメント

```
>dad|M15531-1|AAA49529.1| 177|Rana pipiens protein ( Frog
(R.pipiens) olfactory-specific protein mRNA, complete
cds. ).
Length = 177

Score = 51.9 bits (122), Expect = 3e-05
Identities = 25/56 (44%), Positives = 37/56 (66%), Gaps = 1/56 (1%)
Frame = +1

Query: 157 PVMSNFDPRKILGWYAVAVASNCPEFVQMKV-VMMKPITIFVLDGGLYAATGVQ 324
PVM + R+ G WY +A ASNC +F+QMKV M P+ I+S L+G + ++T Q
Sbjct: 21 FVMKGLEENKVTGVWYGIAASNCQFLQMKSDNMFAPVNIYS-LNNGHMKSTSTFQ 76
```

図6. BlastXによる解析例

図6の解析結果より、このクローンのDNA配列はカエルで見ついている嗅覚特異的タンパク質（その機能は分かっていないが、嗅細胞に多量に発現しているタンパク質）に相同性の高いタンパク質をコードしていることが分かった。嗅覚特異的タンパク質が取れて来たことより、このcDNAライブラリーが嗅覚に関与するタンパク質遺伝子を多く含んでいることが期待される。

6. 現状のまとめと展望

「匂い」センサーチップ作成にむけて、嗅上皮cDNAライブラリーを作成した。これまでのEST解析では、新奇な遺伝子が現れてはいるが、嗅覚受容体遺伝子は得られていない。受容体遺伝子のみをライブラリーからピックアップする方法を取る必要がありそうである。

本研究でのDNA配列解析には、SVBLに設置されているABIのDNAシーケンサーを使用させていただいた。この場を借りて御礼申し上げます。